

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20743

研究課題名（和文）寄生虫感染モデルを用いたマウス小腸上皮における細胞間接着制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of intercellular adhesion control in small intestinal epithelium using parasite infected mouse model

研究代表者

田中 美緒 (Tanaka, Mio)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：00910689

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は腸管寄生線虫であるヴェネズエラ糞線虫が小腸上皮細胞間に侵入する動態の解明を通して腸管上皮のバリア維持機構を紐解くことを目的とした。糞線虫感染マウス小腸組織の形態評価（光学顕微鏡および電子顕微鏡観察）と免疫組織化学を用いた細胞間接着関連タンパクの発現変化解析を通して、糞線虫感染に伴い感染部位局所的に腸管上皮細胞のタイト結合関連分子の発現変化が起こっており、細胞そのものへの障害は非常に少ないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は腸管寄生線虫であるヴェネズエラ糞線虫の小腸上皮侵入機構の解明を通して上皮細胞間結合の調節機構を紐解くことを目的とした。糞線虫感染マウス小腸組織の形態評価と細胞間接着関連タンパクの発現変化解析を通して、糞線虫感染局所における細胞間結合の破綻およびタイト結合関連タンパクの発現分布変化が起こっており、細胞そのものへの障害は非常に少ないことが示唆された。本研究結果はヴェネズエラ糞線虫による小腸上皮細胞間結合の非侵襲的な調節機構の一端を明らかにするものであり、この侵入機構を応用して低侵襲・高効率なドラッグデリバリーシステムの実現や腸バリア機能が損なわれる各種病態解明への応用も期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the mechanism of maintenance of the intestinal epithelial barrier by elucidating the dynamics of invasion of the intestinal parasitic nematode, *Strongyloides venezuelensis*. Morphological evaluation and immunohistochemistry targeting intercellular adhesion-related proteins in small intestinal tissues of mice infected with *S. venezuelensis* suggested that the infection causes very localized changes in expression of tight junction-related molecules in intestinal epithelial cells at the site of infection, with very little damage to the cells themselves.

研究分野：寄生虫学

キーワード：上皮細胞間接着 寄生虫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸管上皮は食物や病原体などの外来物質と常に接触する組織であり、消化吸収等の機能維持と異物侵入阻止を両立させて恒常性を保持する。この制御機構には、細胞間接着装置による外界からのバリア機能が必須である。腸管上皮では、アピカル側からタイト結合、アドヘレンス結合、ヘミデスモソーム、デスモゾームが細胞間接着に貢献し、中でもタイト結合は最も強力なバリア機能を担う。タイト結合は細胞膜接着因子 **claudin, occludin** と、裏打ちタンパク質 **ZO (zonula occludens)** などから構成される。細胞間接着の破綻は感染症や炎症性腸疾患等、様々な病態で報告されているが、その破綻・修復機構については不明な点が多い。タイト結合の破綻を含めた細胞接着制御機構の解明は正常構造・機能の理解だけでなく、病態理解や新規治療法発展という点でも重要である。腸管上皮細胞における細胞接着制御機構の重要因子解明にアプローチするために、申請者はマウス小腸に寄生する線虫であるヴェネズエラ糞線虫 *Strongyloides venezuelensis* の腸管上皮侵入メカニズムに着目した。ヴェネズエラ糞線虫はマウス小腸上皮において、炎症反応や細胞破壊を伴わずにアピカル面から上皮細胞間に侵入する (Dawkins et al., *Parasitol. Res.*, 69, 1983)。この侵入機構はタイト結合をはじめとする細胞間結合を特異的に破綻させ、上皮細胞の傷害を最小限に抑えるという点で他の寄生虫の侵入機構と比較しても非常に特異である。しかしながら、ヴェネズエラ糞線虫の腸管上皮侵入機構、特にタイト結合を破綻させるメカニズムは不明な点が多い。以上より、ヴェネズエラ糞線虫のマウス小腸上皮侵入機構を形態学および分子生物学的視点から明らかにすることにより上皮細胞間接着の維持および破綻機構に関する新たな知見が得られることが期待できると考えた。

2. 研究の目的

本研究ではヴェネズエラ糞線虫によるマウス小腸上皮細胞間接着の破綻機構を形態学的・分子生物学的視点から明らかにすることを目的とした。特に感染マウス小腸組織の光学顕微鏡・電子顕微鏡観察による虫体と周囲上皮細胞との関係性、および免疫組織化学によるタイト結合関連タンパクの発現変化を中心に解析を行った。

3. 研究の方法

(1) ヴェネズエラ糞線虫感染マウス小腸組織の形態学的解析

8週齢・オスの C57/BL6J マウスにヴェネズエラ糞線虫 2000 隻を感染させ、感染 8 日目の小腸組織を採取し、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡による観察を行い、虫体が接する小腸上皮細胞の細胞形態および細胞間結合の形態変化を検討した。

(2) ヴェネズエラ糞線虫感染マウス小腸組織における細胞間結合の発現・分布変化解析

上記と同様の条件でヴェネズエラ糞線虫を感染させたマウス小腸組織においてタイト結合関連タンパクである **claudin-1**、**claudin-2** を標的として免疫組織化学を行い、発現・分布変化を解析した。

4. 研究成果

(1) ヴェネズエラ糞線虫 (Sv) 感染マウス小腸組織の形態学的解析

① 光学顕微鏡観察

光学顕微鏡による観察では、ヴェネズエラ糞線虫感染に伴う周囲組織の炎症は目立たず、組織形態が保たれ、細胞傷害も見られないことから糞線虫の上皮侵入に伴う影響は非常に局所的であることが示唆された (図 1)。一方で、光学顕微鏡レベルでは虫体と隣接する小腸上皮細胞の関係を判断するのは困難であった。

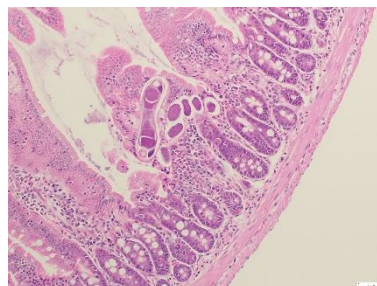


図 1 : Sv 感染侵入部位のマウス小腸絨毛 (HE 染色)

② 透過型電子顕微鏡観察

透過型電子顕微鏡観察により、虫体と隣接する小腸上皮細胞に関して、細胞間に侵入する虫体・虫体分泌物による変形はあるものの、合胞体の形成はなく細胞の破壊は伴わないことを確認した(図 2-1)。また、虫体侵入部位に隣接する上皮細胞の細胞間結合の構造は確認できなかった一方で(図 2-2, 2-3)、非侵入部位では正常構造の形態が確認できた(図 2-4, 2-5)。以上の結果は「虫体が細胞間結合を局所的かつ特異的に破綻させている」という仮説を支持すると思われた。

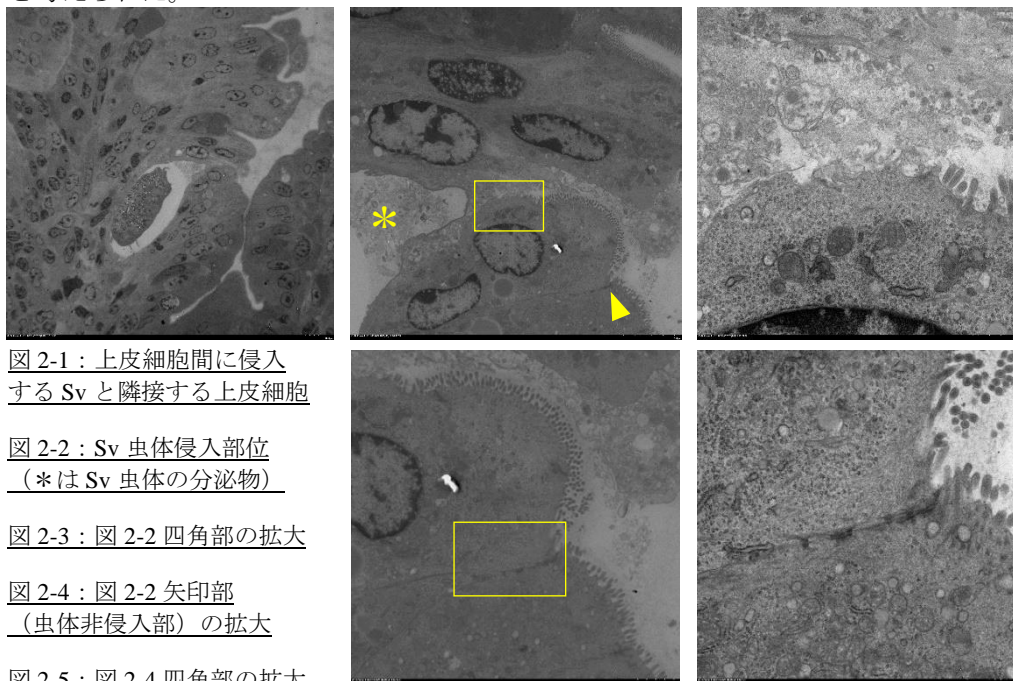


図 2-1 : 上皮細胞間に侵入する Sv と隣接する上皮細胞

図 2-2 : Sv 虫体侵入部位 (*は Sv 虫体の分泌物)

図 2-3 : 図 2-2 四角部の拡大

図 2-4 : 図 2-2 矢印部 (虫体非侵入部) の拡大

図 2-5 : 図 2-4 四角部の拡大

図 2-1	図 2-2	図 2-3
	図 2-4	図 2-5

(2) ヴェネズエラ糞線虫感染マウス小腸組織におけるタイト結合関連タンパクの発現・分布変化の解析

感染マウス小腸および非感染マウス小腸組織におけるタイト結合関連タンパク claudin-1、claudin-2 の発現および分布を免疫組織化学で比較したところ、感染・非感染マウス間で claudin-1 に明らかな変化を認めなかったが(図 3-1、図 3-2)、感染マウス小腸組織、特に感染局所において本来基底側にのみ発現する claudin-2 の発現領域が拡大していた。

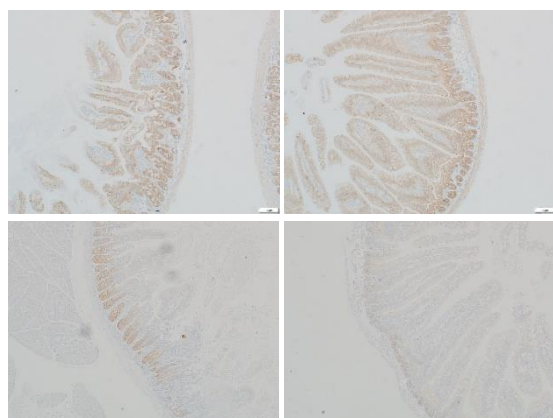


図 3-1 : 感染マウス小腸における claudin-1 発現

図 3-2 : 非感染マウス小腸における claudin-1 発現

図 3-3 : 感染マウス小腸における claudin-2 発現

図 3-4 : 非感染マウス小腸における claudin-2 発現

図 3-1	図 3-2
図 3-3	図 3-4

以上の結果からヴェネズエラ糞線虫は小腸上皮侵入時、侵入局所の上皮細胞間結合を特異的に破綻すると思われた。感染に伴いタイト結合関連タンパクである claudin-2 の発現領域の増加に関して、claudin-2 の発現増加は逆に上皮バリアの破綻に働くことも知られており、糞線虫がこの発現を局所的に調節しながら寄生している可能性も示唆された。本研究結果はこれまで道であったヴェネズエラ糞線虫の小腸上皮侵入に伴う細胞間結合変化の一端を明らかにするものである。今後、種々の細胞間結合タンパク発現量・分布変化の検討、および免疫電顕等の手法を用いたより詳細な解析を通して、ヴェネズエラ糞線虫感染に伴う細胞間結合変化の機構の全体像解明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaguma Y., Sugita N., Choijookhuu N., Yano K., Lee D., Ikenoue M., Fidyaa, Shirouzu S., Ishizuka T., Tanaka M., Yamashita Y., Chosa E., Taniguchi N., Hishikawa Y.	4. 巻 157
2. 論文標題 Crucial role of high-mobility group box 2 in mouse ovarian follicular development through estrogen receptor beta	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 359-369
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-022-02074-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------